

**MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO OPTATIVO DE GRADO**

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

INGENIERÍA EN ALIMENTOS
LIC. en CIENCIAS y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Año: 2019

Presentación de Curso

Nombre del curso optativo: Microbiología de los alimentos

Este curso optativo está destinado a los alumnos de la Carrera Ingeniería en Alimentos y comprende el estudio de los microorganismos que afectan la calidad sanitaria de los alimentos y el agua. Su estudio incluye las características generales de estos microorganismos, aislamiento, caracterización, resistencia al medioambiente, su capacidad para sobrevivir y desarrollarse en los alimentos, las consecuencias de este desarrollo y los factores que influyen en este proceso. Además del conocimiento y aplicación del sistema de análisis de peligro y puntos críticos de control en la elaboración de alimentos, esencial para garantizar la inocuidad de los mismos; como así también el estudio de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) y de los factores epidemiológicos básicos que determinan dichas ETAS.

Tipo de Asignatura

Este curso es de carácter optativo para los alumnos de Carrera Ingeniería en alimentos y forma parte del Área Temática Optativa dentro de la malla curricular. Se dicta a partir del segundo cuatrimestre de cuarto año y tiene un crédito horario total de 60 h y semanal de 10 h, distribuidos en 4 horas de Prácticos de Laboratorio y aula y 6 horas de clases teóricas.

Fundamentación del sentido del Curso dentro del Plan de Estudio

Este curso permitirá al estudiante iniciar su conocimiento en la Microbiología de los alimentos abordando conceptos de conservación, alteración y contaminación de los alimentos por diversos microorganismos. Se estudiarán las técnicas de cultivo y moleculares para el aislamiento de bacterias a partir de matrices alimentarias que junto con el conocimiento de los puntos críticos de control en la cadena de producción alimentaria, aportarán a la inocuidad y conservación de los mismos. Asimismo la determinación de los reservorios, fuentes de infección y otros factores epidemiológicos contribuirán al entendimiento de la cadena de transmisión al ser humano, tomando las medidas necesarias para evitar la diseminación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Prerrequisitos

Las asignaturas correlativas para la realización de éste Curso Optativo son:

Microbiología General: aprobada y Bromatología: regular

Equipo docente

Profesora Responsable:

Dra. Gabriela Isabel Favier

Profesoras Colaboradoras:

Dra. Alba Edith Vega

Dra. María Esther Escudero

Responsables de Trabajos Prácticos:

Dra. Cecilia Lucero Estrada

Lic. Claudia Soledad Cáceres

Auxiliar de Primera:

Dra. Andrea Celeste Arismendi Sosa

Agregado Ad-Honorem:

Alumno Diego Balada

Alumna Lourdes I. Pascual

Personal técnico de apoyo a la docencia

Téc. No-docente Daniel Alberto Molina

Téc. Erick Mauricio Farías

INDICE

	<u>Página</u>
Presentación del curso	II
Equipo docente y técnico de apoyo a la docencia	III
Normas de bioseguridad	V
Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1	1
Trabajo Práctico de Laboratorio N° 2	8
Trabajo Práctico de Aula N° 3	24
Anexo: Programa analítico y/o de examen:	25

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

OBJETIVOS

- Adquirir conciencia de los riesgos potenciales durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología
- Reconocer las vías de infección más comunes en el laboratorio
- Identificar los distintos niveles de bioseguridad en Microbiología y los requerimientos de protección personal, del medio ambiente y de las muestras, en cada uno de ellos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las personas que trabajan en un laboratorio QUÍMICO están expuestas a una serie de riesgos potencialmente graves. Comúnmente están en contacto con sustancias y vapores tóxicos y explosivos, carcinógenos, sustancias cáusticas, altos voltajes, radiaciones, etc. En un laboratorio de Microbiología hay que agregar otro riesgo: la INFECCION por microorganismos.

La INFECCION es la colonización y multiplicación de microorganismos en el hospedador y difiere de la mayoría de los otros riesgos en que los efectos no están limitados a quien trabaja individualmente ni a sus compañeros de trabajo, sino que la infección también puede ser transmitida fuera del laboratorio, a su familia, contactos humanos casuales, y animales domésticos o de experimentación. No debe olvidarse que también pueden diseminarse agentes no patógenos para los seres humanos pero capaces de contaminar medios de cultivo y reactivos.

- Vías de infección más comunes en el laboratorio:

- **tracto digestivo:** ingestión o transferencia de microorganismos desde dedos contaminados.
- **mucosas:** nasal, conjuntiva, por aerosoles y manos contaminadas.
- **piel – vía percutánea:** inyección, cortes o escoriaciones.
- **respiratoria:** es la más importante. El 80% de las infecciones contraídas en el laboratorio de Microbiología es de origen aéreo por inhalación de aerosoles que transportan microorganismos o virus.

- Importancia de la vía respiratoria

Se deben tener en cuenta 3 factores principales.

- La facilidad con que se producen pequeñas gotas y partículas.
- Las pequeñas partículas (entre 1-4 μm) no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan a pulmón.
- La capacidad de la mayoría de los microorganismos patógenos para invadir tejido pulmonar.

- La infectividad de un microorganismo depende de:

- el tamaño de la dosis
- la susceptibilidad individual
- la virulencia del agente (varía con el microorganismo y la cepa)
- el sitio de invasión

- Situaciones de riesgo más comunes en el Laboratorio:

- **Producción de aerosoles**

La producción de aerosoles es generada por dos mecanismos:

- atomización de suspensiones líquidas
- molido muy fino de material sólido infectado

Muchas técnicas de laboratorio producen distintos aerosoles mediante burbujeo, salpicadura, espuma, quemado del ansa, y dos mecanismos adicionales: vibración de alta frecuencia y fuerza centrífuga. Los aerosoles también se producen cuando se manipulan cultivos secos, liofilizados o secados con acetona (ej. cuando se destapan tubos o ampollas).

- **Prácticas incorrectas**

Además de la producción de aerosoles hay que tener en cuenta el riesgo que se genera como consecuencia de la deposición de material infectado sobre distintas superficies, como la mesada de trabajo, elementos personales como cuadernos, lapiceras, y las propias manos, a partir de las cuales los microorganismos pueden ser transferidos a la piel, boca y ojos. Es recomendable el uso de guantes descartables, barbijo y gafas y lavarse las manos al retirarse del laboratorio.

- **Uso de pipetas y pipeteo**

Las pipetas se esterilizan antes de ser utilizadas. Una práctica casi universal en Microbiología es colocar un tapón de algodón en la boquilla de la pipeta para prevenir la entrada de polvo y detener el ascenso de líquido. Sin embargo, el tapón NO protege a quien usa la pipeta ya que es fácilmente contaminado por microorganismos presentes en las suspensiones líquidas. El pipeteo oral debe ser evitado; en su lugar se recomienda el uso de propipeta. Las pipetas contaminadas se descartan siempre en un frasco con lavandina al alcance del operador.

- **El ansa**

Mediante el flameado (quemado al rojo en la llama) del ansa o agujas contaminadas se puede producir diseminación de organismos, especialmente cuando se trabaja con inóculos semi-sólidos (ej. suspensiones de esporas, colonias de *Mycobacterium* o esputo). Esto también puede ocurrir con pequeños volúmenes de líquido. El mismo riesgo se corre cuando se introduce el ansa caliente en un líquido, o se hace contacto con la superficie de un cultivo en medio sólido.

El ansa fría, una vez cargada, puede contaminar cuando se producen vibraciones o rápidos movimientos de aire que causen desprendimiento de pequeñas gotas. Por esta razón, no agite ni sacuda el ansa mientras trabaja.

- **Placas de Petri con medio de cultivo**

La principal fuente de infección resulta cuando una placa de Petri con cultivo cae al suelo y se rompe. El mismo riesgo se corre cuando se utilizan tubos o botellas con agar. En esos casos, neutralice la contaminación con lavandina diluida al 10 % y después de unos minutos comience el operativo de limpieza usando guantes. Confine los restos de vidrio en un recipiente que luego será esterilizado.

- **Tapones y tapas**

La remoción de tapones de algodón, tapas a rosca, tapones de goma o plásticos desde tubos con caldo de cultivo, tubos de centrifuga, etc., puede crear aerosoles de material infectivo, sobre todo si después de agitar los cultivos, los tapones se han humedecido. En ese caso, oriente la boca del tubo hacia el mechero en el momento de abrir. Si es necesario agitar el tubo, hágalo con suavidad para evitar este inconveniente.

Precauciones

Las medidas preventivas incluyen 6 categorías:

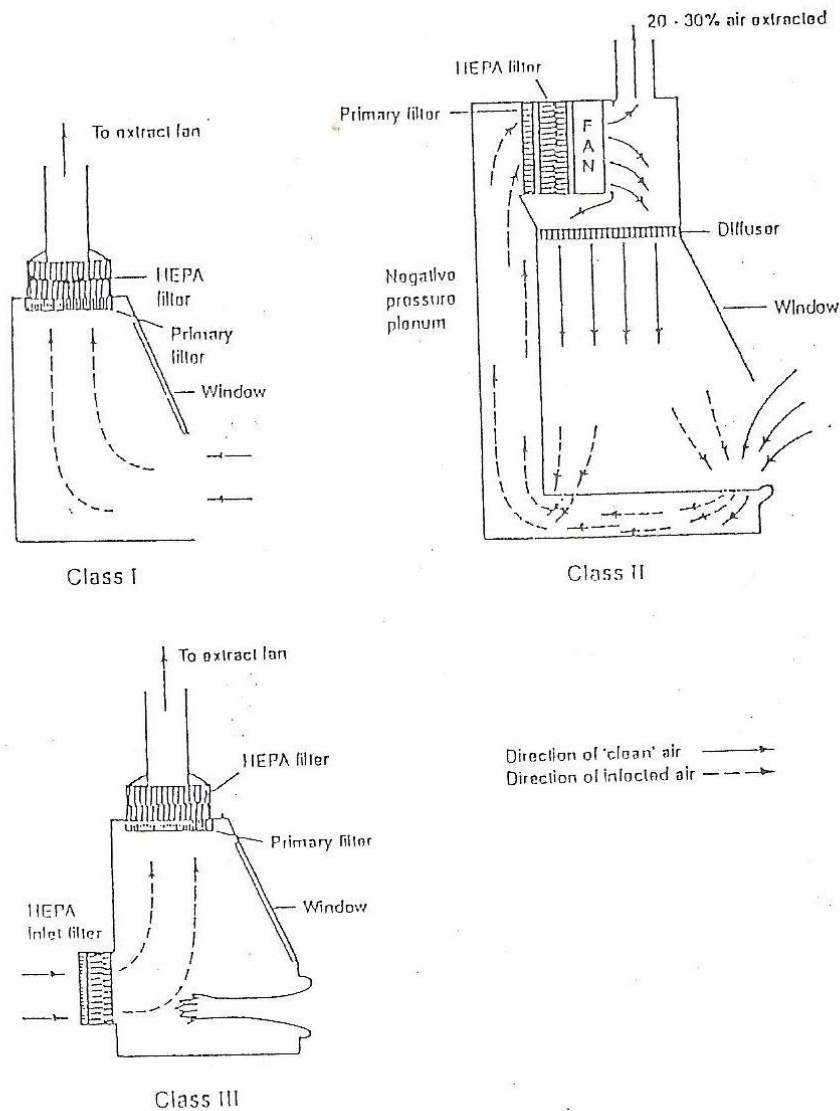
- **protección física del trabajador:** uso de guardapolvo, guantes, barbijo, gafas, propipeta, etc.
- **técnicas cuidadosas:** buen manejo de la técnica aséptica.
- **métodos de confinamiento del agente:** uso de cámaras de bioseguridad, flujo laminar vertical, ambientes aislados con presurización positiva o negativa, recipientes con desinfectante para descartar material contaminado, envases bien tapados, sin filtraciones.
- **barreras intangibles:** desinfección del aire por uso de lámparas UV, áreas estériles.
- **desinfección en general:** empleo de etanol al 70%, alcohol iodado, lavandina diluida u otros productos seleccionados según el caso: piel, superficies inertes, instrumentos metálicos, etc.
- **medidas inmunológicas:** vacunación del personal según normativas de Salud Pública.

Requerimientos para los cuatro (4) niveles de bioseguridad en Microbiología

Nivel	Prácticas y técnicas	Equipamiento	Alcance
1	Prácticas microbiológicas standard.	Ninguno	Agentes bien caracterizados que presentan riesgo mínimo para el personal y el medio ambiente. Ej. <i>Bacillus subtilis</i> .
2	Personal con entrenamiento específico. Acceso restringido.	GBS clase I ó II	Agentes de moderada peligrosidad para el personal y el medioambiente. Ej. <i>Salmonella</i> . Sangre, fluidos corporales, Tejido humano y animal.
3	Acceso más restringido. Registro de visitas y accidentes. Barreras de contención física: máscaras, guantes, rotores sellados, filtros HEPA.	GBS clase II	Agentes con potencial de transmisión aérea que pueden causar infección seria o potencialmente letal. Alto riesgo personal, bajo riesgo comunitario Ej. <i>Mycobacterium</i> , <i>Coxiella</i> .
4	Barreras de aire con el exterior. Cambio de ropa y ducha. Intercambio de ropa sucia a limpia.	GBS tipo III Traje presurizado por tuberías.	Agentes exóticos productores de enfermedades letales para los que no existen vacunas ni terapia. Ej. virus Ébola.

GBS: gabinete de bioseguridad (son áreas de trabajo estériles con flujo laminar vertical)

Esquema de funcionamiento de los gabinetes de bioseguridad



REGLAS A TENER EN CUENTA EN CADA SESIÓN DE LABORATORIO

1. Reportar los accidentes al docente a cargo del Trabajo Práctico, no importa lo insignificante que puedan parecer. Se debe reportar toda enfermedad o lastimadura tan rápido como sea posible. La pérdida de tiempo en la identificación de una infección de laboratorio puede tener graves consecuencias.
2. Tratar a todos los microorganismos como patógenos potenciales para el ser humano, o contaminantes para los cultivos vecinos. **Rotular todo el material infectivo para prevenir confusiones.** Los números en código no son adecuados.
3. Usar ropa y elementos de seguridad (ej. guardapolvo, guantes, máscara, etc).

4. Manejar los materiales cuyo potencial patógeno se desconoce (ej. esputo, suero, material fecal, microorganismos no identificados) como si fueran infectivos, ya que probablemente lo son.
5. El laboratorio debe permanecer siempre limpio. La mesada debe estar libre de todo material que no sea esencial. La superficie debe limpiarse antes y después de cada sesión de laboratorio con una solución germicida. Todo el material contaminado, cultivos, pipetas, tapones, etc., deberá ser esterilizado ANTES de ser lavado.
6. Al retirarse del laboratorio, sacarse el guardapolvo, lavarse cuidadosamente las manos con agua y jabón y desinfectarlas.
7. Tener un desinfectante listo para ser usado en suficiente volumen para llevar a cabo una descontaminación de emergencia en el caso de salpicaduras. Asegurarse que el desinfectante sea activo contra el organismo con el que se está trabajando.
8. Nunca comer, beber, fumar, maquillarse en el laboratorio, o pipetear con la boca. Usar propipetas o pipetas automáticas. Siempre recordar que las manos o los guantes pueden estar contaminados y pueden transferir microorganismos al rostro, ropa y resto del cuerpo.
9. Nunca llevar a cabo una acción apresuradamente, en particular aquéllas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, derrames o contaminar superficies que es necesario mantener limpias (ej. las tapas de las botellas).

BIBLIOGRAFÍA

- Ferrari S., Mattana C., Di Genaro M.S. y Favier G. 2011. Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología. Nueva Editorial Universitaria. ISBN/ISSN 978-987-1595-68-6, UNSL, San Luis, Argentina.
- Microbiological safety cabinets. Reproducido de Collins C.H. Laboratory Acquired infections (2nd ed). Extraído del curso de posgrado Cultivo celulares y sus aplicaciones biotecnológicas. 1994. Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)****OBJETIVOS**

- Definir PCR, conocer los reactivos que se utilizan y las etapas de cada ciclo de una PCR
- Conocer las principales aplicaciones de PCR en Microbiología
- Preparar mezclas de reacción para PCR según protocolos de trabajos científicos.
- Interpretar resultados a partir de la observación de imágenes de geles de agarosa.
- Conocer ventajas y desventajas de esta técnica.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite amplificar de manera exponencial un fragmento específico de genoma (un gen determinado u otra secuencia de ADN). Esta técnica se puede utilizar con diversos propósitos, por ejemplo:

- realizar la identificación de un microorganismo por presencia de una secuencia específica del gen 16S ARNr.
- seleccionar clones por la presencia de genes asociados a virulencia, resistencia a antibióticos, etc.
- establecer relaciones entre cepas durante brotes o en estudios epidemiológicos.

Etapas de cada ciclo de PCR

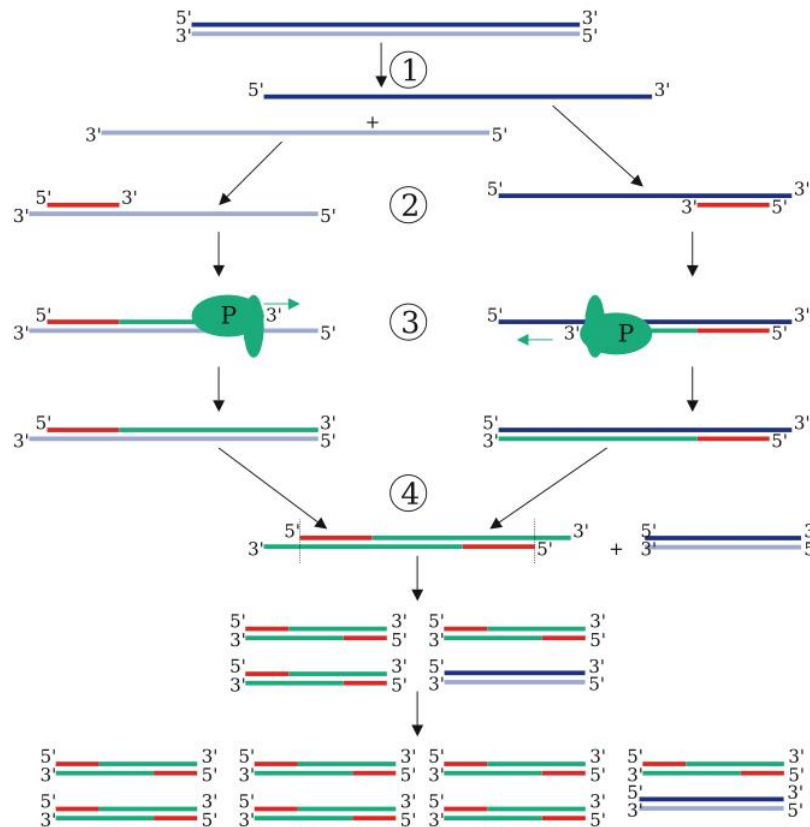
Cada ciclo de PCR incluye 3 etapas que se suceden en la doble hélice de ADN (templado):

1. **Desnaturalización** a 95°C
2. **Hibridización** de cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, a 55-65°C
3. **Elongación** de los primers por Taq polimerasa en presencia de dNTPs, a 72°C

Cada ciclo duplica la secuencia original de ADN.

El ciclo se repite entre 25 a 40 veces según el tamaño del producto de PCR (amplión).

Ver animación de PCR en: <http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>



Esquema de PCR. Primer ciclo de PCR consta de

- 1: desnaturalización del ADN a 95°C,
- 2: hibridación de los primers en las zonas flanqueantes de la secuencia a amplificar a 55-65°C,
- 3: elongación de las nuevas hebras de ADN por Taq polimerasa a 72°C y formación de copias que constan de una hebra de ADN original y una hebra de ADN recién sintetizado.

Técnica

El proceso se desarrolla en un microtubo de PCR de 0,2 ml que contiene todos los reactivos de la reacción. Se llevan los tubos (tantos tubos como muestras se estudian, más un control negativo de reactivos) al termociclador que será programado según protocolo específico.

Análisis de los productos de PCR

El producto obtenido se somete a electroforesis en gel de agarosa. Al fundir la agarosa, se agrega bromuro de etidio, un producto mutagénico que actualmente se reemplaza por Gel Red (un producto menos cancerígeno), se arma el gel con un peine que da forma a los “wells” o pocillos, se colocan los productos de la amplificación uno en cada pocillo y se realiza la electroforesis. La separación de bandas se produce en función sólo de su tamaño, y no de la carga eléctrica porque en este caso el ADN siempre tiene carga negativa y por lo tanto migrará hacia el ánodo.

Una vez terminada la corrida se coloca el gel en un transiluminador y se observa al UV. Una banda de masa molecular apropiada (por comparación con patrones de ADN en el mismo gel) sería indicativa de que el ADN blanco fue amplificado exitosamente.

Ver animación de electroforesis en: <http://www.dnalc.org/resources/animations/electrophoresis.html>

Ventajas

- Rapidez en el diagnóstico
- Mayor sensibilidad que los cultivos
- A partir de una muestra pequeña de ADN se puede obtener una cantidad considerable de copias para el estudio que se vaya a realizar
- El producto se puede utilizar para clonación, secuenciación y análisis.
- Se puede amplificar ADN de cualquier organismo vivo o muerto.

Desventajas

- Falsos positivos por contaminación cruzada (puede ser del mismo investigador o de cualquier otro origen)
- Reactivos costosos
- Se pueden amplificar solamente aquellas partes del genoma en donde se conoce por lo menos una mínima secuencia de 20 – 40 pb que corresponde a las zonas donde deben hibridar los “**primers**” específicos.
- La polimerización puede generar errores al sintetizar el ADN

Conceptos básicos

- **Especificidad:** Generación de un único producto de amplificación.
- **Eficiencia:** Máxima producción de amplificación en función del número de ciclos.
- **Fidelidad:** Número de errores que comete la DNA polimerasa durante la copia (menor número de errores, mayor fidelidad).
- **Sensibilidad:** Mínima cantidad de ADN que se necesita para obtener una gran cantidad de copias.

Características de los componentes de la mezcla de reacción

1. Taq ADN polimerasa

Thermus aquaticus, es una bacteria termófila que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente. Esta bacteria vive a temperaturas comprendidas entre 50 y 80 °C gracias a que sus enzimas resisten tales condiciones. Normalmente, a esas temperaturas las proteínas constitutivas de la mayoría de los seres vivos se desnaturalizan y no vuelven a ser funcionales. Debido a esa termorresistencia, la

enzima que *T. aquaticus* emplea para replicar su ADN se utiliza con frecuencia en las reacciones de PCR.

En la PCR se separan las cadenas de la doble hélice del ADN mediante desnaturalización térmica a temperaturas en torno a los 95°C, lo que conduciría a la inactivación de las ADN polimerasas ordinarias. La polimerasa Taq, en contraste, tiene su máxima actividad a 72 °C y su termoestabilidad es tal que su vida media a 95°C es de 40 minutos, lo que la hace idónea para este tipo de procesos.

2. Primers, iniciadores o cebadores

Con estos nombres se conocen a los oligonucleótidos de cadena simple que se necesitan para iniciar la replicación ya que la enzima polimerasa utiliza un OH⁻ libre para poder polimerizar.

Condiciones que debe tener un primer:

- tamaño: 15 – 30 pares de bases
- porcentaje GC: 40 -60 %.
- no deben tener, entre ellos, una diferencia mayor a 5°C en la temperatura melting

El annealing o apareamiento de los primers con el templado (ADN a amplificar) depende de:

- tiempo
- temperatura
- concentración de los primers
- concentración del templado
- longitud de los primers
- bases que componen a los primers

La **temperatura de fusión o “melting” (T_m)** es la temperatura a la cual el 50% de los primers y su hebra complementaria de ADN forman un dúplex. Para oligonucleótidos de 20 bases de longitud o menos se calcula como:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

La **temperatura de “annealing” (T_a)**, hibridización o pegado de los primers al templado, es una temperatura más baja que la T_m, lo cual incrementa la probabilidad de pegado correcto de los primers a su secuencia blanco complementaria. Se calcula como:

$$T_a = T_m - 5^\circ \text{ a } 10^\circ\text{C}$$

3. Deoxinucleótidos (dNTPs), dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Durante la realización de la PCR, los 4 nucleótidos tienen que encontrarse en igual concentración. La concentración óptima es entre 10 y 15 µM.

4. Mg²⁺

La concentración de Mg²⁺ afecta: la unión de los primers al ADN molde; especificidad del producto; actividad de la enzima; formación de dímeros de primer. Es por esto que debe ensayarse la concentración óptima para cada sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas de bacterias en cultivo para realizar extracción de ADN.
- Material de plástico descartable (tubos Eppendorf, tips de distintos volúmenes, microtubos de PCR)
- Reactivos necesarios para PCR y electroforesis horizontal
- Termociclador
- Calculadora científica

ACTIVIDADES A REALIZAR

a. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizará según el método de “boiling” como se describe:

1. Envasar 150 µl de buffer TE + Tritón X100 al 1% en tubo Eppendorf.
2. Desde un cultivo puro de la cepa en estudio levantar células desde confluencia o colonias aisladas con ansa recta, y suspender en el buffer TE + Tritón hasta obtener turbidez evidente. Cerrar y hacer punción delicada en la tapa con ansa recta al rojo vivo para evitar que el tubo Eppendorf se abra cuando se coloque en baño de agua a ebullición.
3. Llevar a baño de agua a ebullición durante 15 min, centrifugar 5 min a 10000-12000 rpm, y transferir 50 µl de sobrenadante (donde se encuentra el ADN) a un tubo Eppendorf estéril, para ser utilizado como templado en la PCR.

b. PCR simple dirigida al gen 16S ARNr

Mezcla de reacción:

Los primers utilizados son:

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	pb
Forward	GGAATTTAGCAGAGATGCTTTAG	300
Reverse	GGACTACGACAGACTTTATGTG	

Preparación de la mezcla de reacción:

- Tomar un tubo Eppendorf para preparar la mezcla de reacción para 5 muestras + un control positivo + un control negativo + un control de reactivos.

Reactivo	Concentración stock del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla de reacción	1x (µl)	Ax (µl)
Buffer	10 x	1 x		
Mezcla dNTPs	2,5 mM	0,1 mM		
Cl ₂ Mg	50 mM	1,5 mM		
Primer F	0,1 nmol/µl	2 pmol/ul		
Primer R	0,1 nmol/µl	2pmol/µl		
Taq polimerasa	5U/µl	0,02 U/µl		
Templado (ADN)			2	
H ₂ O ultrapura				
Vol. final			25	

- Rotular microtubos de PCR estériles.
- Fraccionar 23 µl de la mezcla de reacción preparada anteriormente en los 8 tubos.
- Microtubos de muestras 1 a 5: agregar 2 µl de ADN de cada cepa en el tubo correspondiente.
- Microtubo C+ (control positivo): agregar 2 µl de templado de STEC.
- Microtubo C- (control negativo): agregar 2 µl de templado de *E. coli* no patógena.
- Microtubo CR (control de reactivos): agregar 2 µl de agua ultrapura estéril.

Programa de amplificación de PCR para *stx1/stx2* en termociclador

- Pre-PCR: 94 °C 5 min (garantiza la completa desnaturalización del ADN)
- PCR: 25 ciclos de: 94 °C 30 s, 54°C 30 s, 72 °C 30 s
- Post-PCR: extensión a 72 °C 3 min (asegura la completa extensión de las hebras de ADN). El programa se desarrolla en un tiempo aproximado de 1.5 h.

c. Detección de los productos de amplificación.

- Preparar un gel de agarosa al 2 %, pesando 0,8 g de agarosa en 40 ml de buffer TAE (Tris-ácetico-EDTA) 0,5X, fundir en microondas, esperar que la temperatura descienda ligeramente y agregar 1,5 µl de solución stock del colorante GelRed. Mezclar agitando suavemente.
- Armar el gel usando peines para 15 pocillos. Esperar aproximadamente 30 min para asegurar la completa solidificación de la agarosa.
- Colocar el soporte con la agarosa solidificada en la cuba de electroforesis y verter buffer TAE 0,5X hasta cubrir ligeramente los pocillos.

- Colocar 2 µl de buffer de siembra en cada tubo con producto de PCR (la muestra se tiñe de color azul y, por el glicerol del buffer, adquiere suficiente densidad para permanecer dentro del pocillo de agarosa), mezclar varias veces con pipeta estéril y usando una pipeta diferente por muestra sembrar 10 µl en cada pocillo.
- Sembrar el gel en las siguientes posiciones:
- Correr a 80 Volts por 30 min.
- Observar en un transiluminador UV.
- Fotografiar e interpretar los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, M.T.; Maetinko, J.M; Parker Y. 2015. Brock Biología de los Microorganismos. 14ª ed. Ed Pearson Printice Hall.
- Tortora, G, J., Funke, B.R., Case, C. L. 2007. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Leotta GA, Chinen I., Epszteyn S., Miliwebsky ES, Melamed IC., Motter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M. 2005. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev. Arg. Microbiol.* 37:1-10.
- Salinas AG., Lucero Estrada C., Escudero ME, Lazarte Otero V., Velázquez L., Guzmán AMS., Rigo H., Correa S. 2009. Detección de toxina Shiga en *Escherichia coli* O157:H7 por PCR múltiple en cultivo y materia fecal humana. XXII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, 11-13 diciembre 2009, La Punta, San Luis.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PASTAS FRESCAS RELLENAS

OBJETIVOS

- Investigar la presencia de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito reductores, hongos y levaduras, en una muestra de pasta fresca rellena.
- Informar presencia/ausencia o ufc/g de los microorganismos investigados, según corresponda, y establecer la calidad microbiológica de la muestra analizada.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos más altamente contaminados son los de origen animal (huevos, carnes rojas y blancas, leche). Entre las muestras con contenido de huevo se hallan las pastas.

Todos los protocolos de investigación de microorganismos son esencialmente similares y comprenden:

- preenriquecimiento con fines de reparación de las células estresadas
- enriquecimiento selectivo
- aislamiento en medios selectivos y diferenciales
- estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas
- análisis antigénico en dos fases: a) empleo de antisueros polivalentes, y b) utilización de antisueros específicos
- tipificación por medio de bacteriófagos

Los alimentos que han estado sometidos a desecación por calor, conservadores, congelamiento, alta presión osmótica, variaciones de pH, deben ser preenriquecidos en un medio no inhibidor para permitir el desarrollo de aquellas bacterias que hayan sufrido daño subletal.

Los alimentos crudos y productos terminados que hayan sido groseramente contaminados luego del procesamiento, pueden ser enriquecidos directamente en caldos selectivos para estimular el desarrollo de microorganismos de interés y prevenir el desarrollo de microorganismos de la flora acompañante.

Al realizar el análisis microbiológico de las pastas, debemos informar si se cumplimentan los requisitos del capítulo IX del Código Alimentario Argentino que reglamenta la producción y venta de alimentos farináceos- cereales, harinas y derivados, dentro de los cuales se encuentran los productos de fideería.

El Artículo 720 - (Res 305, 26.03.93) cita: “Las **pastas frescas no rellenas** en todos los casos deberán mantenerse refrigeradas y expendirse dentro de las 48 horas y responder a las siguientes exigencias microbiológicas:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UFC/g

***Salmonella*:** ausencia: en 25 g".

El Artículo 720bis - (Res 305, 26.03.93) cita: "Las **pastas frescas rellenas** podrán ser elaboradas con rellenos preparados a base de ingredientes alimenticios de uso permitido, como por ejemplo carnes, verduras, papas, quesos, ricota, sesos. En todos los casos deberán mantenerse refrigeradas y expendirse dentro de las 48 horas. Responderán a las siguientes exigencias microbiológicas:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UFC/g

***Clostridium* sulfito reductores:** menor de 10^3 UFC/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g".

Artículo 721 - (Res 687, 27.08.98) cita: "Las **pastas y las pastas frescas rellenas** podrán ser adicionadas de propionato de sodio y/o calcio entre otros conservantes. Los productos que hayan sido adicionados de las sustancias conservadoras mencionadas deberán expendirse en envases cerrados, bromatológicamente aptos y deberán llevar con caracteres bien visibles todos los requisitos de rotulación, la mención del conservador empleado, la indicación "Manténgase refrigerado" y la fecha de vencimiento (día, mes y año). Deberán mantenerse y transportarse refrigerados y cumplirán las siguientes exigencias microbiológicas:

a) Pastas frescas sin relleno:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UCF/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g

Hongos y levaduras: menor de 10^4 UFC/g".

b) Pastas frescas rellenas:

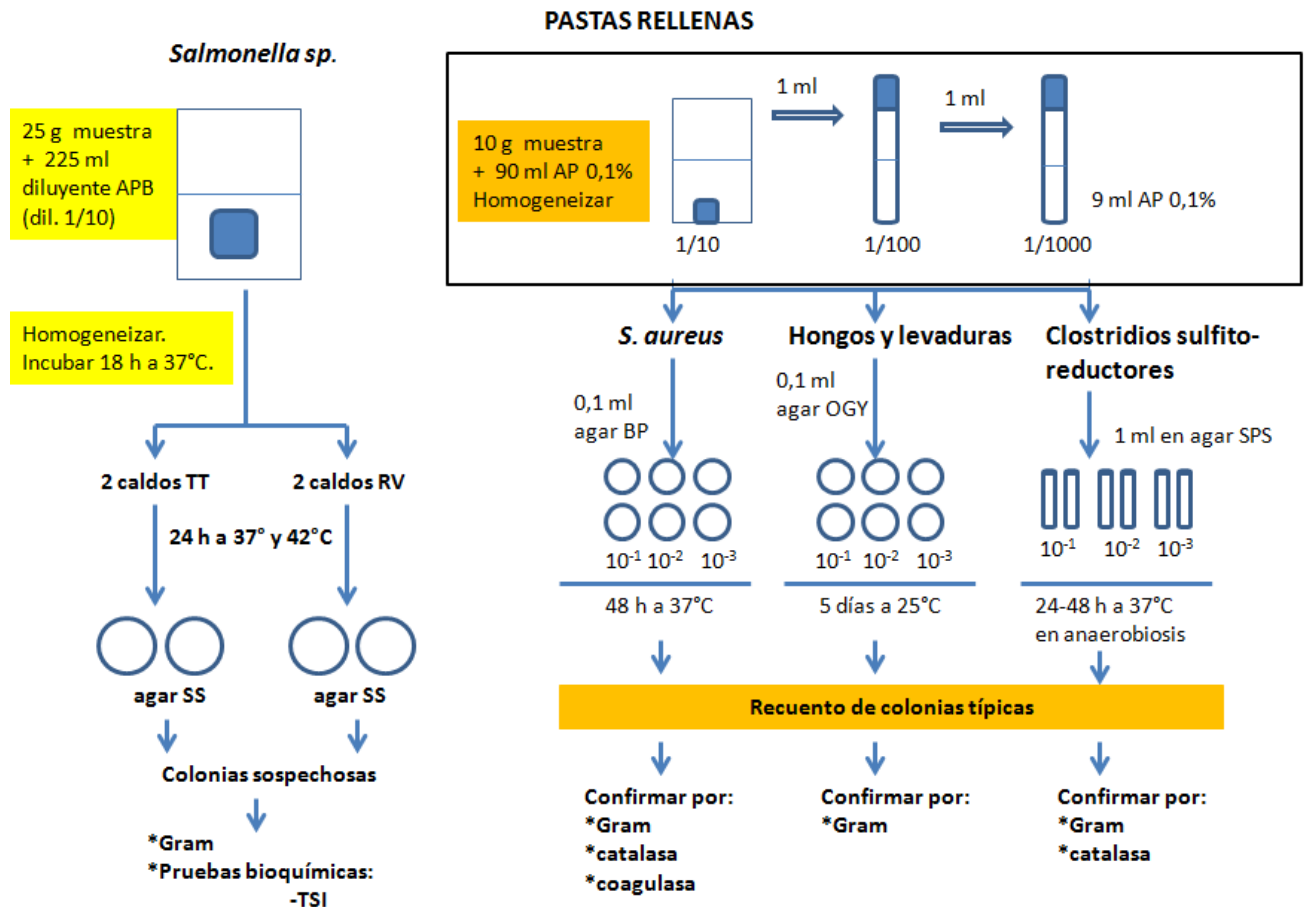
***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UCF/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g

***Clostridium* sulfito reductores:** menor de 10^3 UFC/g

Hongos y levaduras: menor de 10^4 UFC/g".

Diagrama de flujo para investigar microorganismos patógenos y del deterioro en pastas frescas rellenas



MATERIALES Y MÉTODOS

A. Investigación de *Salmonella* sp.

Procedimiento

1° día: Preenriquecimiento

1. Pesar asépticamente 25 g de muestra en una bolsa de polietileno estéril.
2. Agregar una porción de un volumen total de 225 ml de agua peptonada bufferada (APB) estéril contenida en un frasco y homogeneizar en stomacher durante 1 min. Transferir el contenido de la bolsa al frasco que contiene el resto del medio de cultivo.
3. Incubar 18 h a 37°C.

2° día: Enriquecimiento

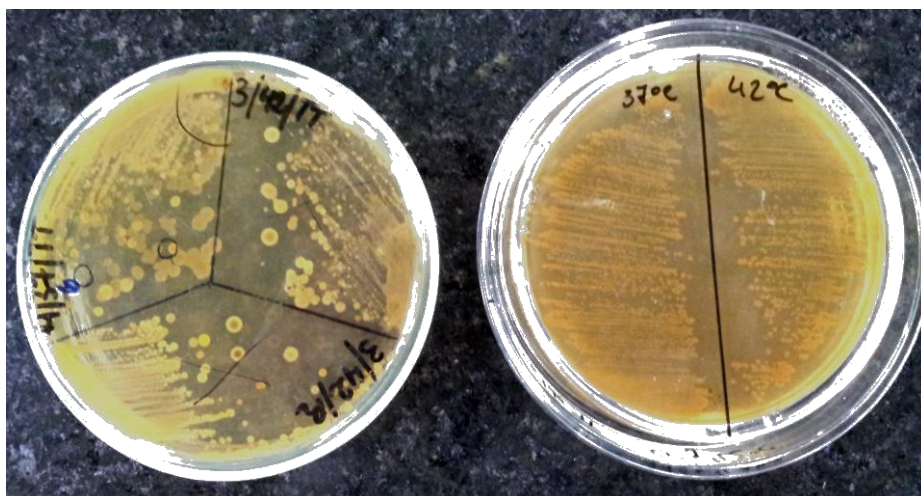
4. Desde APB transferir 1 ml de cultivo a 9 ml de caldo Rapaport-Vassiliadis (RV) y 1 ml a 9 ml de caldo tetracionato (TT). Hacerlo por duplicado.
5. Incubar un juego de RV y TT a 37°C, y el otro juego a 42°C durante 24 h.

**3° día: Aislamiento**

6. A partir de cada tubo de RV y TT, sembrar en agar *Salmonella-Shigella* (SS)
7. Incubar 24 h a 37°C.

4° día: Identificación de colonias sospechosas de *Salmonella*

8. Observar la presencia de colonias sospechosas de *Salmonella* en agar SS: colonias no fermentadoras de lactosa con centro negro.



9. Seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y sembrar en TSI y LIA. Incubar 24 h a 37°C. Los cultivos de *Salmonella* presentan:

- TSI: fondo amarillo (ácido), pico rojo (alcalino), con o sin H₂S.
- LIA: color púrpura (reacción alcalina) con ennegrecimiento del medio si hay producción de H₂S.

5° día: Ensayo de aglutinación en placa con antisueros y pruebas bioquímicas adicionales para *Salmonella*

10. De las cepas caracterizadas por TSI y LIA típicos de *Salmonella*, sembrar las siguientes pruebas bioquímicas:

Prueba bioquímica	Resultado
TSI	+K/A
ONPG	negativo
Lisina decarboxilasa	positiva
Ornitina decarboxilasa	positiva
Arginina decarboxilasa	positiva
Glicerol	negativa
SIM	+ - +
Rojo de metilo	positivo
Voges Proskauer	negativo

Ensayos sugeridos por el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias para identificar *Salmonella* (INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán, 2013).

10. Realizar ensayos de aglutinación en placa con antisueros polivalentes OA y OB. En caso de resultados positivos, enviar la cepa al Servicio Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, para confirmación y determinación de serovariedad.

Informar PRESENCIA o AUSENCIA de *Salmonella* en 25 g de muestra.

El CAA establece AUSENCIA de *Salmonella* en 25 g de muestra.

Medios de cultivo empleados para investigar *Salmonella***Agua peptonada bufferada (APB)**

Peptona de caseína.....	10 g
NaCl.....	5 g
Fosfato disódico.12H ₂ O.....	9 g
Fosfato monopotásico.....	1,5 g
A.D.....	1000 ml

pH = 7,0 ± 0,2

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Caldo Rapapport-Vassiliadis (RV)

Triptona.....	4,54 g
Cloruro de sodio.....	7,2 g
Cloruro de magnesio.6 H ₂ O.....	28,6g
Fosfato dipotásico.....	0,18 g
Fosfato monopotásico.....	1,26 g
Verde de malaquita.....	0,036 g
A.D.....	1000 ml

pH = 5,1 ± 0,2

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Caldo tetratiónato (TT)

Polipeptona.....	5 g
Sales biliares.....	1 g
Carbonato de calcio.....	10 g
Tiosulfato de sodio.....	30 g
A.D.....	1000 ml

pH= 7,0 ± 0,1

Mezclar los componentes. Calentar a ebullición. Enfriar a 45°C.

Agar *Salmonella Shigella* (SS)

Extracto de carne.....	5 g
Proteosa peptona o polipeptona.....	5 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares.....	8.5 g
Tiosulfato de sodio	8.5 g
Citrato férrico	1 g

Agar.....	13.5 g
Verde brillante (0.33 ml de sol. al 0.1%)	0.33 mg
Rojo neutro (2.5 ml de sol. al 0.1%)	25 mg
A.D.	1000 ml

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

No esterilizar en autoclave. Se prepara asépticamente disolviendo los componentes en agua destilada estéril.

Medios diferenciales para pruebas bioquímicas empleadas para identificar *Salmonella*

-Agar TSI

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Extracto de carne	3,0 g
Pluripectona	20,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa.....	10,0 g
Glucosa.....	1,0 g
Sulfato de hierro y amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar.....	13,0 g
AD.....	1000 ml

$$\text{pH: } 7,3 \pm 0,2$$

Suspender 62,5 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

-Agar lisina hierro (LIA)

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H₂S. Es muy utilizado en las técnicas de búsqueda de Salmonella, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

Fundamento

Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado se formarán aminas que provocan un retorno al color original del medio o hacia un viraje al básico (color violeta). En la desaminación se produce un ácido carboxílico y NH₃ y se visualiza en la superficie la aparición de un color rojo intenso. La producción de H₂S a partir de tiosulfato se visualiza por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

Peptona.....	5g
Extracto de levadura.....	3g
Glucosa	1g
L-lisina HCl.....	10 g
Citrato férrico amónico.....	0,5 g
Tiosulfato de sodio.....	0,04 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

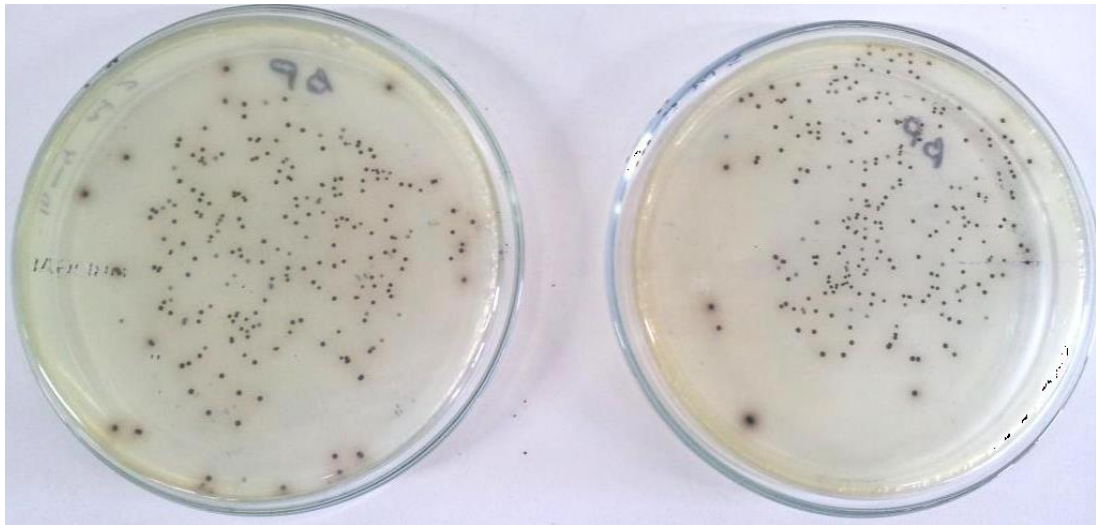
pH = 6,7± 0,2

B. Investigación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Procedimiento

1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogeneizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10⁻¹.
2. Tomar 1 ml de la dilución 10⁻¹ y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 0,1% (dilución 10⁻²). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10⁻³.
3. Sembrar por extensión en superficie alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³, por duplicado, en placas de agar Baird Parker. Extender el inóculo con espátula de Drigalski. Mantener las placas 10 min hacia arriba para que el inóculo sea absorbido.

4. Invertir las placas e incubar a 37°C, 48 h.



Interpretación:

Colonias sospechosas de *S. aureus* se caracterizan por ser circulares, lisas, convexas, negras, húmedas, rodeadas de zona opaca y frecuentemente una zona clara por fuera de la zona opaca.

5. Realizar recuento provisorio y continuar confirmación de colonias presuntivas mediante pruebas bioquímicas.

6. Seleccionar colonias y realizar los siguientes ensayos con cada una de ellas:

- Gram
- Test de la coagulasa
- Test de la catalasa

-Test de la coagulasa

La coagulasa es una enzima con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Se cree que la coagulasa funciona in vivo, produciendo una barrera en el sitio de infección estafilocócica. En el laboratorio, la prueba de coagulasa se utiliza más comúnmente para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otros *Staphylococcus*.

Fundamento

La coagulasa se halla presente en dos formas, “libre” y “fija”, cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas de determinación diferentes:

Coagulasa fija (prueba en portaobjetos): la coagulasa fija está unida a la pared celular bacteriana. Los hilos de fibrina formados entre las células suspendidas en plasma (que contiene fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos.

Coagulasa libre (prueba en tubo): la coagulasa libre es una enzima extracelular que se halla presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

Procedimiento

Prueba en portaobjetos: colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, emulsionar suavemente el microorganismo en estudio en la gota de agua de manera de obtener una suspensión cargada homogénea. Agregar una gota de plasma reconstituido junto a la gota de la suspensión del microorganismo. Mezclar bien con el ansa. Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado observando la formación inmediata de un precipitado granular o de grumos blancos.

Prueba en tubo: colocar asépticamente 0,5 ml de plasma reconstituido en el fondo de un tubo estéril. Añadir 0,5 ml de cultivo de *Staphylococcus* de 24 horas en caldo cerebro corazón (o suspensión en suero fisiológico de un cultivo en placa). Mezclar por rotación el tubo, evitando remover o agitar el contenido. Colocar en baño de agua a 37°C y observar cada hora hasta 4 horas y luego a las 24 horas, la formación de un coágulo visible.

Interpretación:

S. aureus es **positivo** para todas estas pruebas.

El CAA establece para *S. aureus* coagulasa positiva: valor admitido menor de 1×10^3 ufc/g

Medios de cultivo empleados para investigar *S. aureus*

Agua peptonada al 0,1% (AP)

Peptona1 g
A.D.1000 ml

pH = $7,0 \pm 0,2$

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Agar Baird Parker (BP)

Triptona1 g
Extracto de carne0,5 g
Extracto de levadura0,1 g
Piruvato de sodio1 g
Glicina1,2 g
LiCl.6H₂O0,5 g
Agar2 g
A.D.100 ml

pH = $7,0 \pm 0,2$

Suspender en 95 ml de agua destilada. Calentar a ebullición para disolver. Autoclavar 15 min a 121°C. Enfriar a 55-60°C y agregar aditivos.

Aditivos:

- a) Emulsión de yema: se adicionan 5 ml en 100 ml de agar BP. Usar pipeta con punta rota.
- b) Telurito de potasio al 3,5% en agua destilada (esterilizar por filtración): calentar antes de usar para disolver, y agregar 0,3 ml en 100 ml de agar BP.

Caldo cerebro corazón (CCC)

Infusión de cerebro de ternero.....	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico anhidro	2,5 g
Glucosa.....	2 g
A.D.	1000 ml

pH = 7,4 ± 0,1

Autoclavar 15 min a 121°C.

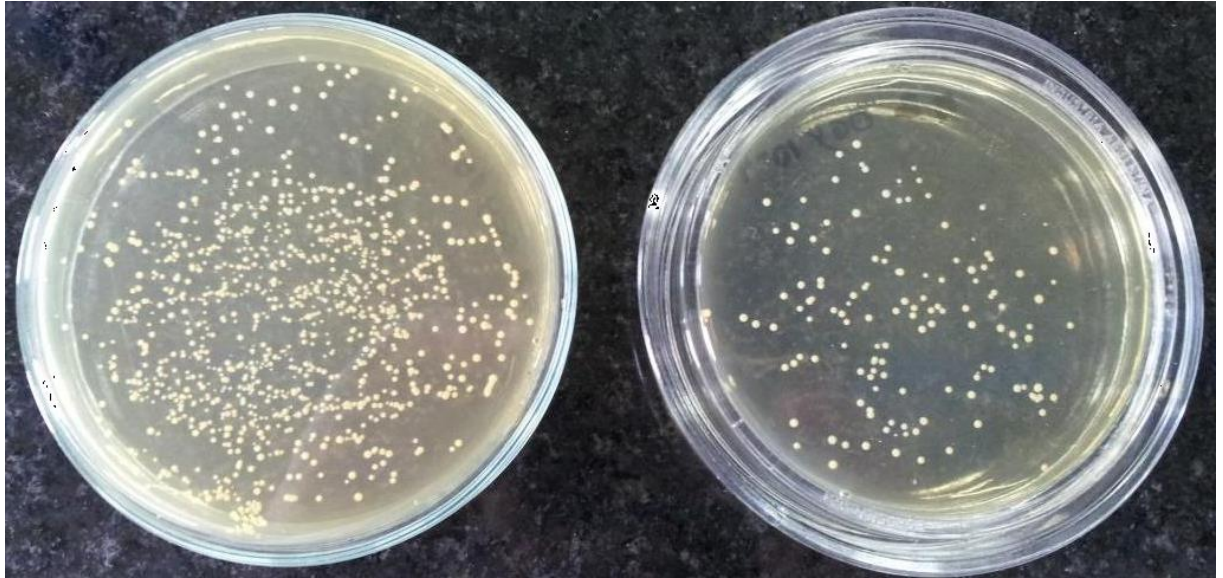
Aditivo: plasma coagulasa (Difco o BBL)

C. INVESTIGACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS

Procedimiento

1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogenizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10^{-1} .
2. Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 1% (dilución 10^{-2}). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10^{-3} .
3. Sembrar alícuotas de 0.1 ml de cultivo a partir de diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , por duplicado, en la superficie de placas con agar oxitetraclina-glucosa-extracto de levadura (OGY). Extender el inóculo con espátula de Drigalski. Mantener las placas 10 min hacia arriba para que el inóculo sea absorbido.
4. Invertir las placas e incubar a 22-25°C, 24-48 h.

Interpretación: **Colonias típicas de levaduras** son circulares, lisas, convexas, blancas y húmedas (levaduras). **Colonias típicas de hongos filamentosos** son secas, algodonosas, de diversos colores. Realizar Gram en caso de duda.



Informar número de UFC de hongos y levaduras /g de alimento.

El CAA establece para hongos y levaduras: valor admitido menor de 10^4 ufc/g.

Medio de cultivo empleado para investigar hongos y levaduras

Agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (OGY)

Extracto de levadura.....	5g
Dextrosa.....	20g
Agar.....	15g
AD.....	1000 ml

pH = 6,5 $\pm$ 0.2

Calentar a ebullición para disolver. Autoclavar 15 min a 121°C. Dejar enfriar a 55°C y agregar aditivos: oxitetraciclina 0,1 g ó bien gentamicina 0,05 g. Mezclar y verter en placas de Petri.

4. Investigación de *Clostridium* sulfito reductores

PROCEDIMIENTO 1

-RECuento (sin enriquecimiento)

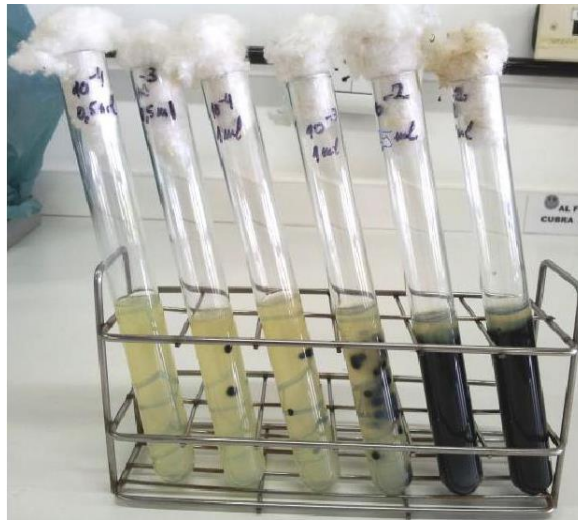
1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogenizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10^{-1} .

2. Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 1% (dilución 10^{-2}). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10^{-3} .

3. Sembrar, por duplicado, 1 ml de cada dilución en tubos con 9 ml de agar sulfito polimixina sulfadiacina (SPS) a 50-55°C, haciendo círculos con pipeta mientras se coloca el inóculo. Estos tubos

se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva. El agar SPS debe ser preparado en el momento. Las placas se incuban en anaerobiosis por evacuación-reemplazo.

4. Incubar a 37°C, 24-48 h hasta 3 días.



Interpretación *Clostridium* sulfito-reductores forma **colonias de color negro en SPS**. Realizar recuento en placas o tubos que contienen entre 5 y 50 colonias negras.

5. Hacer pruebas confirmatorias desde cultivo: Gram, catalasa, medio hierro-leche, etc.

Informar UFC de *Clostridium* sulfito-reductores por Gramo de alimento.

***Clostridium* sulfito reductores: valor admitido menor de 10^3 ufc/g**

PROCEDIMIENTO 2

-ENRIQUECIMIENTO para determinación de PRESENCIA/AUSENCIA de *Clostridium* sulfito reductores

1. Preparación de la muestra: como se indicó en Procedimiento 1.
2. Sembrar por duplicado alícuotas de 1 ml de la dilución 10^{-1} en tubos conteniendo 9 ml de caldo tioglicolato hervido previamente 10 min, y enfriado rápidamente bajo canilla. Evitar agitación. Estos tubos se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva.
3. Incubar a 37°C, 24-48 h. Observar producción de gas y turbidez.
4. Desde los tubos de caldo tioglicolato que presentan turbidez y gas, sembrar alícuotas de 1 ml en tubos con 9 ml de agar SPS a 50-55°C, haciendo círculos mientras se coloca el inóculo con pipeta. Estos tubos se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva. El agar SPS debe ser preparado en el momento.
5. Incubar a 37°C, 24-48 h hasta 3 días.

6. Se observa el desarrollo **de colonias negras** que pueden confluir. Hacer pruebas confirmatorias desde cultivo: Gram, catalasa, medio hierro-leche, etc.

Informar PRESENCIA o AUSENCIA de *Clostridium* sulfito-reductores por Gram de alimento.

Medios de cultivo

-Caldo tioglicolato

Extracto de levadura.....	5 g
Casitone.....	15 g
Glucosa.....	5 g
NaCl	5 g
L-cisteína.....	0,75 g
Ácido tioglicólico.....	0,30 g
Agar.....	0,75 g
Resazurina	0,0001 g
AD.....	1000 ml

Ajustar el pH a $7 \pm 0,2$

Envasar y esterilizar 15 min a 120°C. Antes de sembrar, hervir 15 min y enfriar rápidamente.

-Agar SPS

Peptona de caseína.....	15 g
Extracto de levadura.....	10 g
Fe (III) citrato.....	0.5 g
Sodio sulfito	0.5 g
Polimixina B sulfato	0.01 g
Sulfadiazina sódica	0.12 g
Agar.....	15 g
A.D.....	1000 ml

pH = $7,0 \pm 0,1$

Esterilizar durante 15 min a 121°C.

ACTIVIDADES A REALIZAR

En la primera jornada, se procederá a realizar toma de muestra desde pasta rellenas (ravioles), y se realizará la siembra en medios de enriquecimiento y aislamiento para *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, hongos-levaduras y *Clostridium* sulfito reductores.

En el segundo encuentro, se efectuará la lectura e interpretación de los resultados obtenidos hasta ese momento, y se mostrarán medios de cultivo y pruebas bioquímicas sembradas con muestras de pastas artificialmente contaminadas para obtener resultados positivos.

Se informarán los resultados para:

- la muestra sembrada por los alumnos
- las muestras artificialmente contaminadas

Tomando como referencia los valores máximos admitidos por el CAA, se establecerá la calidad del alimento analizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Código Alimentario Argentino:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf
- Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual:
<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>
- Frade H., Fernández M. C. 2004. Enfermedades transmitidas por alimentos. Asociación Argentina de Microbiología. ISBN 987-98475-9, Buenos Aires.
- Proveedores de medios de cultivo en Argentina:
- www.britanialab.com.ar
- www.merck.com.ar
- Producción fotográfica: María Cecilia Villa

*Informe de Laboratorio***ANÁLISIS MICROBIOLOGICO DE PASTAS FRESCAS RELLENAS****Solicitado por:****Procedencia de la muestra:****Muestra:****Características del envase:****Rótulo del envase:** Fecha de elaboración:

Fecha de vencimiento:

Fecha de recepción de las muestras en el Laboratorio de Microbiología:**Fecha de entrega del informe:****RESULTADOS****Investigación de *Salmonella spp.***

Muestra: en 25 g

Valor admitido por CAA: **ausencia en 25 g****Investigación de hongos y levaduras**

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^4 ufc/g****Investigación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva**

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^3 ufc/g****Investigación de *Clostridium* sulfito reductores**

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^3 ufc/g**

Observaciones: la muestra analizada **cumple / no cumple** con las exigencias microbiológicas establecidas por el Código Alimentario Argentino (CAA, Art 721) para pastas frescas rellenas a los días de elaboración.

Firma Responsable

Trabajo Práctico de Aula N°3**Métodos rápidos de investigación de patógenos en alimentos****OBJETIVOS**

Interpretar trabajos científicos relacionados a métodos rápidos de investigación de patógenos en alimentos.

Preparar una exposición oral con la incorporación de terminología científica y métodos multimedia.

GUÍA PARA LA PREPARACIÓN DE SEMINARIOS

1. Cada seminario se preparará en grupos de 2 alumnos
2. Es necesario preparar una presentación multimedia de no más de 20 min.
3. Se realizarán 5 min de preguntas, tanto por parte del personal docente como por los compañeros alumnos.
4. Cada presentación debe constar de las siguientes secciones:
 - Título del trabajo, autores, revista dónde se publicó, año de publicación
 - Introducción, no mayor a 2 diapositivas
 - Objetivos y/o hipótesis según lo planteado en el trabajo
 - Metodología: no siempre es necesario incluir esta sección, sólo se lo hace cuando es necesario que explique alguna técnica de uso poco frecuente o que no fue desarrollada en las clases teóricas del curso
 - Resultados
 - Conclusiones